



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 7/00, 5/00 // A61K 39/12, 39/05, 39/13	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/47648 (43) Date de publication internationale: 23 septembre 1999 (23.09.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00578 (22) Date de dépôt international: 15 mars 1999 (15.03.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/03333 13 mars 1998 (13.03.98) FR (71) Déposants (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR). MERIAL S.A.S. [FR/FR]; 29, avenue Tony Garnier, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (<i>US seulement</i>): HEIMINDINGER, Pierre [FR/FR]; Le Montségur, 35, rue Bataille, F-69008 Lyon (FR). (74) Mandataire: KERNEIS, Danièle; Pasteur Merieux Sérums et Vaccins, Direction de la Propriété Industrielle, 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
(54) Title: MEDIUM AND METHOD FOR VIRAL PROPAGATION AND GROWTH (54) Titre: MILIEU ET PROCEDE DE PROPAGATION ET DE MULTIPLICATION VIRALES (57) Abstract <p>The invention concerns a medium for viral propagation and growth on cultivated cells, characterised in that it is free of human or animal proteins and it comprises proteins or glycoproteins extracted from potatoes or cucumber, having a mitogen potential and whereof the molecular weight ranges between 1000 and 200000 daltons and/or plant extract hydrolysates.</p> (57) Abrégé <p>L'invention a pour objet un milieu de propagation et de multiplication virales sur des cellules en culture, caractérisé en ce qu'il est dépourvu de protéines humaines ou animales et en ce qu'il comprend des protéines ou glycoprotéines extraites de pommes de terre ou de concombre, ayant un potentiel mitogène et dont le poids moléculaire est compris entre 1 000 et 200 000 daltons et/ou des hydrolysats d'extraits végétaux.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	B Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

MILIEU ET PROCEDE DE PROPAGATION ET DE MULTIPLICATION VIRALES

La présente invention est relative à un milieu et à un procédé de propagation et de multiplication virales sur des cellules en culture, notamment pour la production de
5 vaccins.

La production de vaccins viraux, qu'ils soient simplement atténués, inactivés, sous-unitaires ou recombinants, implique la production, à grande échelle, de virus.

Cette production peut être effectuée, selon la nature du virus, sur différents supports
10 permettant la réplication du virus ; ainsi, par exemple, pour la plupart des vaccins contre la grippe actuellement commercialisés, la prolifération des virus est effectuée sur des œufs de poules embryonnés, alors que pour certains vaccins contre l'encéphalite japonaise, cette étape est effectuée sur des cerveaux de souris.

Or, l'utilisation de tels supports pose de nombreux problèmes : disponibilité,
15 reproductibilité, mais surtout sécurité du fait des contaminations possibles par des virus, des mycoplasmes ou tout autre élément indésirable provenant du support. De plus en plus, on cherche donc à s'affranchir de tels supports et on utilise, à chaque fois que cela est possible, des cultures cellulaires que l'on infecte par une faible quantité du virus à produire et que l'on maintient ensuite dans des conditions
20 favorables à la réplication des virus à l'intérieur des cellules infectées, ainsi qu'à la propagation de l'infection d'une cellule à l'autre. Les virus produits sont ensuite récoltés, soit à partir du milieu de culture dans lequel baignent les cellules lorsqu'il s'agit de virus intracellulaires quittant la cellule après leur bourgeonnement (ce qui a notamment pour avantage de permettre de réaliser plusieurs récoltes de virus
25 avec les mêmes cellules en culture), soit par traitement des cellules elles-mêmes lorsqu'il s'agit de virus intracellulaires.

Ces techniques impliquent de disposer de cultures cellulaires de bonnes qualités ; de nombreux développements de l'art antérieur ont donc porté sur l'amélioration des cultures cellulaires et notamment sur les milieux de culture utilisés. Afin de
30 limiter les risques de contamination des cellules par des mycoplasmes, des virus, des agents de l'encéphalopathie bovine spongiforme ou tout autre agent transmissible non conventionnel, il a été proposé d'utiliser des milieux de culture dépourvus de sérum, et même de protéine, ainsi que cela est décrit dans la

demande de brevet WO 96/15231. De façon alternative, la demande FR 2732347 propose l'utilisation de milieu de culture cellulaire dépourvu de sérum animal, mais contenant des extraits végétaux.

5 Ainsi, grâce à l'utilisation de tels milieux pour l'étape de culture des cellules, la sécurité des produits obtenus à l'aide des cellules ainsi produites est accrue.

Cependant, lorsqu'il s'agit de produire des virus entrant dans la composition de vaccins, les étapes consécutives à cette phase de culture cellulaire, doivent, elles aussi, présenter le maximum de sécurité.

En effet, de manière classique, et ainsi que cela est décrit dans le brevet US
10 4525349 lorsqu'on utilise des cellules en culture pour la production de virus, une fois la phase de culture des cellules effectuée, le milieu qui a été utilisé pour la culture cellulaire est évacué puis remplacé par un nouveau milieu dans lequel les cellules baignent pendant un moment afin d'être lavées ; ce nouveau milieu est ensuite éliminé ; cette opération de lavage des cellules peut éventuellement être
15 renouvelée un certain nombre de fois.

On introduit, ensuite, dans la culture cellulaire un nouveau milieu qui va permettre aux cellules d'une part de survivre et d'être infectées par les virus et d'autre part, de disposer d'éléments suffisants pour être le support de la réplication de ces virus. Or, ainsi que cela est décrit dans l'article « Protein-free culture of Vero cells : A
20 substrate for replication of human pathogenic viruses », *Cell Biology International, Vol. 17 N°9, 1993 pp885-895*, même dans le cas où la culture cellulaire est réalisée en milieu sans protéine, le milieu de culture utilisé dans l'art antérieur lors de cette étape de multiplication et de propagation virales contient généralement du sérum de veau foetal ou pour limiter les problèmes de
25 contamination, du moins de l'albumine humaine. L'utilisation de l'albumine humaine, à ce stade d'un procédé de fabrication de vaccins viraux, est considérée sans risque pour la qualité du vaccin. Cependant, dans le but d'éliminer complètement tout risque, même théorique, il serait souhaitable de pouvoir disposer d'un milieu apte à la propagation et à la multiplication de virus sur un
30 support constitué par des cellules en culture, dépourvu de protéine humaine ou animale, même d'origine recombinante, mais permettant cependant des rendements de production compatibles avec les exigences industrielles afin de ne

pas accroître les coûts de production des vaccins comprenant des virus produits sur cellules en culture.

Le but de l'invention est notamment de proposer un tel milieu.

- 5 Un autre but de l'invention est de proposer un milieu et un procédé de propagation et de multiplication virales permettant ensuite, lorsque cela est souhaité, de procéder à une étape d'inactivation des virus.

- 10 Pour atteindre ces différents buts, la présente invention a pour objet un milieu de propagation et de multiplication virales sur des cellules en culture, caractérisé en ce qu'il est dépourvu de protéines humaines ou animales, même d'origine recombinante, et en ce qu'il comprend des éléments d'origine végétale.

- 15 Selon une caractéristique de l'invention, le milieu de propagation et de multiplication virales comprend des protéines ou glycoprotéines extraites de pommes de terre ou de concombre, ayant un potentiel mitogène et dont le poids moléculaire est compris entre 1 000 et 200 000 daltons.

-
- 20 Selon un mode particulier de réalisation, le milieu selon la présente invention comprend des hydrolysats végétaux.

Selon une caractéristique particulière de l'invention, les protéines ou glycoprotéines sont extraites de pommes de terre.

- 25 Selon une autre caractéristique de l'invention, les protéines ou glycoprotéines sont obtenues de la manière suivante :
- lavage et broyage des végétaux,
 - dilution en milieu aqueux,
 - thermocoagulation du mélange obtenu ,
 - 30 - purification par chromatographie.

Selon une caractéristique de l'invention, les hydrolysats végétaux sont obtenus par hydrolyse chimique et/ou enzymatique de matières premières telles que le coton, le

soja, le blé ou le riz. De particulièrement bons résultats ont été obtenus avec les produits de la gamme HyPepTM fournis par la Société QUEST INTERNATIONAL, en particulier avec les produits comprenant une forte proportion de peptides dont la masse moléculaire est inférieure à 1000 daltons.

5

Selon une autre caractéristique, le milieu de propagation et de multiplication virales selon l'invention est particulièrement adapté à la multiplication virale sur cellules VERO.

- 10 Selon une autre caractéristique, le milieu de propagation et de multiplication virales selon l'invention est particulièrement approprié à la multiplication des virus de l'encéphalite japonaise, des virus de la poliomyélite, des virus de la rage.

- 15 La présente invention a également pour objet un procédé de fabrication de vaccins viraux comportant une phase de production virale sur cellules en culture, caractérisé en ce qu'on procède à la phase de propagation et de multiplication des virus en présence d'un milieu dépourvu de protéine humaine ou animale même d'origine recombinante, et comprenant des extraits végétaux.

- 20 La présente invention sera mieux comprise à la lecture de la description qui va suivre.

- Le milieu et le procédé selon l'invention sont adaptés à la production de tous les virus aptes à se répliquer sur des cultures cellulaires. Il peut notamment s'agir des
25 virus appartenant aux familles suivantes : orthomyxovirus, paramyxovirus, reovirus, picornavirus, flavivirus, arenavirus, herpesvirus, poxvirus, et les adénovirus. Il peut également s'agir de virus recombinants. De manière particulière, l'invention est particulièrement adaptée à la production de virus susceptibles de rentrer dans la composition de vaccins, et notamment de vaccins
30 humains pour lesquels les exigences de sécurité sont maximales. Il peut en particulier s'agir des virus de la poliomyélite, de la rage, de l'encéphalite japonaise, de la fièvre jaune, de la rubéole, des oreillons, de la Dengue, de la rougeole, des différentes hépatites, du SIDA, de la varicelle, de l'herpes, des maladies

provoquées par le virus syncytial respiratoire, le cytomegalovirus, l'EBV, les rotavirus ou la grippe.

La présente invention est particulièrement avantageuse pour la production des virus responsables de la poliomyélite, de la rage, de l'encéphalite japonaise, de la
5 rubéole, de la varicelle, de l'hépatite A, de la grippe, de la Dengue, de la rougeole, des oreillons.

Les cellules susceptibles d'être utilisées pour la production de virus selon l'invention sont toutes les cellules aptes à se multiplier en culture et permissives au
10 virus que l'on souhaite produire. Il peut notamment s'agir de cellules VERO, de cellules CV-1, de cellules LLC-MK2, de cellules MDCK, de cellules MDBK, de cellules WI-38, de cellules MRC5 (fibroblastes humains), ou encore de cellules BHK21. On a obtenu de particulièrement bons résultats avec des cultures de cellules VERO ou des cultures de cellules MRC5.

15 La culture cellulaire peut être effectuée selon les différentes techniques habituellement utilisées : en cytotraceurs, en flacons roulants, sur boîtes de Roux, sur Multitray™, sur Cell-Cube™. On préfère, pour des raisons industrielles, effectuer la culture cellulaire en cytotraceurs, en utilisant des microsupports constitués par exemple par des billes de Cytodex™.

20 Cette culture cellulaire peut être réalisée dans différentes conditions, notamment en ce qui concerne le milieu utilisé ; il est en effet possible, de mettre en œuvre la présente invention alors que le milieu de culture utilisé pour la phase de croissance cellulaire contenait du sérum ou du moins des protéines humaines ou animales ; dans ce cas, bien sûr, il sera nécessaire de procéder à un lavage parfait des cellules
25 avant leur infection, afin de ne pas perdre l'avantage apporté par la mise en œuvre de l'invention en ce qui concerne l'absence de risque de contamination.

Cependant, on préfère utiliser des cultures cellulaires obtenues en utilisant un milieu de culture cellulaire dépourvu également de protéines d'origine humaine ou animale.

30 Selon la nature des cellules utilisées et des virus à produire, le moment le plus opportun pour procéder à l'infection des virus par un inoculum du virus peut varier. En général, on procède à cette opération plutôt au milieu ou en fin de la

phase exponentielle de croissance ; on a remarqué, en effet, que dans ces conditions, les résultats obtenus étaient particulièrement satisfaisants.

Selon l'invention, le milieu de culture utilisé pour l'étape de propagation et de multiplication virales est un milieu dépourvu de protéine humaine, animale ou recombinante, mais comprenant des protéines ou glycoprotéines extraites de pommes de terre ou de concombre, ayant un potentiel mitogène et dont le poids moléculaire est compris entre 1000 et 200 000 daltons et/ou des hydrolysats d'extraits végétaux. Ce milieu est un milieu pouvant comprendre tout ou partie des éléments classiquement utilisés pour la multiplication virale, tel que le milieu HAM F 12, mais additionné d'extraits végétaux, obtenus par exemple de la manière suivante :

- réduction de la pulpe végétale,
- traitement de la pulpe obtenue par un solvant,
- évaporation du solvant,
- purification de l'extrait obtenu par chromatographie.

Le potentiel mitogène des protéines ou glycoprotéines convenant aux fins de l'invention peut être apprécié grâce notamment à des tests d'analyse de croissance cellulaire et d'activité mitogénique, tels que les tests de coloration au M.T.T.

Les extraits végétaux convenant aux fins de l'invention sont notamment ceux décrits dans la demande de brevet FR 2732347. On peut également utiliser les produits commercialisés par la Société Biomedica sous la dénomination GCR1003, TCR1005, ou BCR1008, seuls ou en combinaison, ou encore le produit PROLIFIX commercialisé également par cette Société et comprenant tous les éléments nutritifs du milieu classique HAM F 12 additionné des extraits végétaux appropriés.

Alternativement, il est possible d'utiliser un milieu classique HAM F 12 additionné d'hydrolysats végétaux tels que les produits HyPep™ à raison de 5g/l.

Il est possible également d'utiliser un milieu comprenant à la fois les protéines ou glycoprotéines obtenues par thermocoagulation de la pulpe de végétaux et des hydrolysats végétaux tels que ceux mentionnés ci-dessus.

- 5 De plus, il est possible d'ajouter à ces milieux tout autre élément susceptible d'améliorer ou de faciliter une des étapes conduisant à l'obtention d'un vaccin, de même qu'il est possible de modifier légèrement ce milieu sans en changer les caractéristiques.
- 10 Les exemples qui suivent illustrent, de façon non limitative des modes de réalisation de l'invention.

EXEMPLE 1 PRODUCTION DE VACCINS CONTRE L'ENCEPHALITE JAPONAISE.

15

On utilise pour produire le virus responsable de l'encéphalite japonaise des cellules VERO. Les cellules utilisées sont des cellules issues de la souche distribuée par l'ATCC (American Type Culture Collection) sous le N° ATCC-CCL 81- VERO F 1415 qui est au 124^{ème} passage et qui est amené au 137^{ème} passage de façon conventionnelle. Le virus que l'on souhaite produire est le virus de la souche P3 au 88^{ème} passage fourni par le NVSI.

20

On remplit la cuve d'un cytotecteur de 15 litres avec du milieu ISCOVE additionné de 4% de serum de veau contenant des microporteurs *Cytodex 1*TM à une concentration de 3,5g/l. Onensemence le milieu par un inoculum de cellules VERO à raison de 200 000 cellules /ml.

25

La culture est amplifiée et subcultivée 2 fois par semaine tous les 4-5 jours. Les concentrations cellulaires que l'on obtient sont comprises entre 2 et 3.10⁶ par ml. On rince ensuite la suspension cellulaire obtenue avec le milieu de propagation virale dans le but d'éliminer le maximum de sérum de veau résiduel.

30

Afin de tester un milieu selon l'invention comparativement à un milieu de l'art antérieur, on effectue la même opération en parallèle, dans plusieurs cytotecteurs identiques ,avec 2 milieux différents :

- un milieu selon l'invention constitué par le milieu HAM F 12 (fourni par Life Technologies GIBCO) additionné par du milieu PROLIFIX II fourni par la Société BIOMEDIA, à une concentration 10 fois celle indiquée à leur catalogue de 1996, dans une proportion de 1 volume de PROLIFIX II concentré 10 fois pour 10 volumes de HAM F 12,
 - un milieu selon l'art antérieur constitué par le milieu ISCOVE(fourni par Life Technologies GIBCO) additionné par de l'albumine humaine afin d'obtenir une concentration finale en albumine dans le milieu de 0,3%.
- 10 Après rinçage, un inoculum de virus est introduit dans chacun des cytotecteurs, en quantité correspondant à une MOI (Multiplicity Of Infection) de 1/6000. Le contenu des cytotecteurs est ensuite maintenu sous agitation à une température de 37°C pendant 3 jours, puis on procède à la 1^{ère} récolte par récupération du milieu de propagation virale qui est devenu une suspension virale, que l'on
- 15 remplace dans chacun des cytotecteurs par une quantité égale de milieu frais de même nature ; on effectue ensuite toutes les 24 heures une récolte du milieu de propagation, ceci jusqu'à 5 récoltes. Chacune des récoltes est filtrée sur filtre dont le seuil de coupure est de 0,22µm, et stockée à +5°C en attendant d'être mélangée avec les 4 autres récoltes issues du même cytotecteur.
- 20 Lorsque les 5 récoltes ont été effectuées, elles sont mélangées, puis ce mélange est concentré par filtration jusqu'à un facteur de 100. Le mélange constitué par les 5 récoltes issues d'un même cytotecteur constitue un lot.
- Afin de déterminer la quantité de virus produits, on réalise pour chacun des lots
- 25 produits un test de l'activité infectieuse. Le test est réalisé de 2 façons différentes : soit en activité infectieuse mesurée sur nappe cellulaire, soit en activité infectieuse mesurée sur souris par inoculation intracérébrale aux souris, observation des animaux pendant 14 jours et calcul de DL50 .
- Les résultats sont exprimés en Log 10 de particules infectieuses par litre de
- 30 cytotecteur. Lorsqu'on considère le titrage sur cellules, la moyenne des résultats obtenus pour les différents lots produits en utilisant un milieu selon l'invention est de 8,84 alors que la moyenne obtenue pour les lots produits en utilisant un milieu selon l'art antérieur est de 7,85. Si on considère le titrage sur souris, la moyenne

pour les lots produits selon l'invention est cette fois de 9,22 alors que la moyenne des lots produits avec un milieu selon l'art antérieur est de 9,30. On constate donc, de façon inattendue, que les résultats obtenus avec le milieu selon l'invention sont équivalents à ceux obtenus avec un milieu de l'art antérieur, alors qu'on s'attendait à ce que le défaut d'albumine qui est une protéine considérée comme jouant un rôle important dans le transport des éléments nutritifs à l'intérieur de la cellule, ait pour conséquence une réduction importante de la quantité de virus produits.

Les lots obtenus ont ensuite été inactivés par l'ajout d'une solution de formaldéhyde en quantité permettant d'avoir une concentration finale dans le mélange de 1/4000 et maintenue à température ambiante sous agitation continue pendant 14 jours. La vérification de l'inactivation par un contrôle selon le protocole recommandé par l'OMS (Rapport technique 771 de 1988) a montré que les lots produits étaient conformes aux recommandations de l'OMS.

Ces lots inactivés ont ensuite été purifiés par chromatographie échangeuse d'ions et par gel filtration afin d'en éliminer toutes les protéines virales et les impuretés résiduelles non souhaitées dans les vaccins. Le mélange obtenu a ensuite été formulé pour conduire à la production de doses vaccinales. La bonne qualité des vaccins produits a été vérifiée grâce au test d'immunogénicité sur souris recommandé par l'OMS pour les vaccins contre l'encéphalite japonaise, consistant à déterminer le taux d'anticorps neutralisants produits par des souris immunisées. L'activité des vaccins produits selon le procédé de l'invention n'étant pas inférieure à celle des vaccins de l'art antérieur, cela confirme qu'il est possible, grâce au milieu et au procédé selon l'invention, de produire des vaccins viraux dans des conditions de sécurité accrue, en s'affranchissant de l'utilisation d'albumine.

EXEMPLE 2 : COMPARAISON DE DIFFERENTS MILIEUX SELON L'INVENTION.

30

On utilise pour tester différents milieux de façon comparative, des flacons de 150 cm³ que l'on remplit par 50 ml de milieu ISCOVE additionné de 4 % de sérum de veau. Ce milieu estensemencé par un inoculum de cellules VERO à raison de

250000 cellules / cm². Les flacons sont laissés 4-5 jours à 37 ° C puis sont rincés au moyen du milieu de multiplication et de propagation virales.

Les milieux utilisés sont les suivants :

- un milieu A qui est un milieu selon l'art antérieur constitué par le milieu
- 5 ISCOVE(fourni par Life Technologies GIBCO) additionné par de l'albumine humaine afin d'obtenir une concentration finale en albumine dans le milieu de 0,3%,
- un milieu B constitué par du milieu HAM F 12 additionné des molécules mitogènes suivantes :
- 10 * BCR 1008 à raison de 10⁻³ g/l
- * TCR 1005 à raison de 10⁻⁴ g/l
- * GCR 1003 à raison de 10⁻⁴ g/l.
- un milieu C constitué par le milieu cité ci-dessus (HAM F 12 additionné de BCR 1008, de TCR 1005, de GCR 1003) mais comprenant en outre 1g/l du produit
- 15 HYPER 4602 constitué par de l'hydrolysate de gluten et fourni par la Société QUESTEL International,
- un milieu C' identique au milieu C mais dans lequel la concentration en HYPER 4602 est de 5g/l
- un milieu D constitué par du milieu HAM F 12 additionné de HYPER 4602 à
- 20 raison de 1g/l, mais dépourvu des molécules mitogènes BCR 1008, TCR 1005, ou GCR 1003.
- un milieu D' identique au milieu D mais dans lequel la concentration en HYPER 4602 est de 5g/l.

- Après rinçage, un inoculum de virus de l'encéphalite japonaise identique à celui de
- 25 l'exemple précédent, est introduit dans chacun des flacons en quantité correspondant à une MOI de 1/6000.

Le contenu des flacons est ensuite maintenu pendant 3 jours à 37°C avant que l'on procède à la 1^{ère} récolte. Les récoltes suivantes sont effectuées de la même manière que décrite à l'exemple précédent.

- 30 Les tests de détermination de titre infectieux sont effectués sur cellules BHK21 et donnent les résultats suivants, exprimés en DICC₅₀/ml (Log 10) :

Milieu A : 4,6

Milieu B : 5,1

Milieu C : 5,0

Milieu C' : 5,6

Milieu D : 5,4

Milieu D' : 6,3.

- 5 Ces résultats confirment que les milieux selon l'invention permettent d'obtenir d'aussi bons rendements, si ce n'est meilleurs que les milieux selon l'art antérieur qui contiennent de l'albumine.

EXEMPLE 3 PRODUCTION DE VACCIN CONTRE LA RAGE

10

On réalise une culture de cellules VERO dans un cytotqueur de 2l en milieu classique, puis après lavage, on infecte les cellules par du virus de la rage avec une MOI de 1/1000, et on maintient les cellules dans un milieu identique à celui décrit à l'exemple 1 (soit milieu HAM F12 supplémenté en PROLIFIX™ II) ; la même

- 15 expérience est réalisée de façon parfaitement identique, dans un autre cytotqueur de même capacité, avec comme seule différence l'utilisation d'un milieu de propagation et de multiplication virales de l'art antérieur comprenant de l'albumine humaine. On effectue des récoltes successivement 4, 5, 6 et 7 jours après l'infection. Les numérations effectuées sur les récoltes obtenues grâce au milieu
20 selon l'invention et sur les récoltes obtenues grâce au milieu selon l'art antérieur ont permis d'obtenir des résultats comparables avec les 2 milieux ; de même, les titres infectieux des virus obtenus étaient équivalents.

Ces résultats démontrent donc la possibilité de produire sur cellules du virus contre la rage.

25

EXEMPLE 4 PRODUCTION DE VACCIN CONTRE LA POLIOMYELITIS

- On a effectué des essais de production de virus de la poliomyélite de type 1 sur des cellules VERO en culture. Les titres infectieux des virus obtenus en utilisant un
30 milieu de propagation et de multiplication virales selon l'invention ayant la composition décrite à l'exemple 1 étaient équivalents à la moyenne des titres infectieux obtenus avec les récoltes effectuées avec le milieu utilisé pour la fabrication des vaccins actuellement commercialisés.

REVENDEICATIONS

1. Milieu de propagation et de multiplication virales sur des cellules en culture,
5 caractérisé en ce qu'il est dépourvu de protéine humaine ou animale, même d'origine recombinante, et en ce qu'il comprend des extraits végétaux.
2. Milieu selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend des protéines ou glycoprotéines mitogènes extraites de pommes de terre ou de concombre.
10
3. Milieu selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les protéines ou glycoprotéines sont obtenues de la manière suivante :
 - réduction de la pulpe de pomme de terre ou de concombre,
 - traitement de la pulpe par un solvant,
 - 15 ■ traitement par thermocoagulation,
 - purification par chromatographie.
4. Milieu selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend des hydrolysats d'extraits végétaux.
20
5. Milieu selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les cellules utilisées pour le support de la propagation et de la multiplication virales sont des cellules VERO.
- 25 6. Milieu selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les virus produits sont des virus de l'encéphalite japonaise, de la rage, de la poliomyélite, de l'hépatite A, de la grippe, de la Dengue, de la rougeole, des oreillons, de la varicelle, de la rubéole.
- 30 7. Milieu selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que les virus produits sont des virus de l'encéphalite japonaise destinés à être utilisés dans des vaccins humains.

8. Procédé de fabrication de vaccins viraux comportant une phase de production virale sur cellules en culture, caractérisé en ce qu'on procède à la phase de propagation et de multiplication des virus en présence d'un milieu dépourvu de protéine humaine ou animale, même d'origine recombinante, mais comprenant des
- 5 extraits végétaux.
9. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce que le milieu de propagation et de multiplication virales comprend des protéines ou glycoprotéines extraites de pommes de terre ou de concombre, ayant un potentiel mitogène et
- 10 dont le poids moléculaire est compris entre 1 000 et 200 000 daltons.
10. Procédé selon une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que le milieu de propagation et de multiplication virales comprend des hydrolysats végétaux.



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 7/00, 5/00 // A61K 39/12, 39/205, 39/13	A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/47648 (43) Date de publication internationale: 23 septembre 1999 (23.09.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00578 (22) Date de dépôt international: 15 mars 1999 (15.03.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/03333 13 mars 1998 (13.03.98) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR). MERIAL S.A.S. [FR/FR]; 29, avenue Tony Garnier, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): HEIMINDINGER, Pierre [FR/FR]; Le Montségur, 35, rue Bataille, F-69008 Lyon (FR). (74) Mandataire: KERNEIS, Danièle; Pasteur Merieux Sérums et Vaccins, Direction de la Propriété Industrielle, 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i> (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 4 novembre 1999 (04.11.99)
(54) Title: MEDIUM AND METHOD FOR VIRAL PROPAGATION AND GROWTH (54) Titre: MILIEU ET PROCEDE DE PROPAGATION ET DE MULTIPLICATION VIRALES (57) Abstract <p>The invention concerns a medium for viral propagation and growth on cultivated cells, characterised in that it is free of human or animal proteins and it comprises proteins or glycoproteins extracted from potatoes or cucumber, having a mitogen potential and whereof the molecular weight ranges between 1000 and 200000 daltons and/or plant extract hydrolysates.</p> (57) Abrégé <p>L'invention a pour objet un milieu de propagation et de multiplication virales sur des cellules en culture, caractérisé en ce qu'il est dépourvu de protéines humaines ou animales et en ce qu'il comprend des protéines ou glycoprotéines extraites de pommes de terre ou de concombre, ayant un potentiel mitogène et dont le poids moléculaire est compris entre 1 000 et 200 000 daltons et/ou des hydrolysats d'extraits végétaux.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.
PCT/FR 99/00578

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N7/00 C12N5/00 //A61K39/12,A61K39/205,A61K39/13

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 498 537 A (BRESLER HERBERT S ET AL) 12 March 1996 (1996-03-12) the whole document	1-10
A	FR 2 732 347 A (BIO MEDIA) 4 October 1996 (1996-10-04) cited in the application the whole document	1-10
A	CINATL J ET AL: "PROTEIN-FREE CULTURE OF VERO CELLS: A SUBSTRATE FOR REPLICATION OF HUMAN PATHOGENIC VIRUSES" CELL BIOLOGY INTERNATIONAL, vol. 17, no. 9, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 885-895, XP000578808 ISSN: 1065-6995 the whole document	1-10
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 September 1999

Date of mailing of the international search report

13/09/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/00578

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>WO 98 46244 A (GILLESSEN HUBERT JEAN MARIE FR ;FEVA N V (NL)) 22 October 1998 (1998-10-22) esp. revendications et page 2, 1.26ff -----</p>	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/00578

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5498537 A	12-03-1996	AU 1930495 A WO 9524467 A	25-09-1995 14-09-1995
FR 2732347 A	04-10-1996	NONE	
WO 9846244 A	22-10-1998	AU 6856498 A CA 2258501 A EP 0912191 A NO 985906 A	11-11-1998 22-10-1998 06-05-1999 26-01-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. e Internationale No
PCT/FR 99/00578

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N7/00 C12N5/00 //A61K39/12,A61K39/205,A61K39/13

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 498 537 A (BRESLER HERBERT S ET AL) 12 mars 1996 (1996-03-12) le document en entier ---	1-10
A	FR 2 732 347 A (BIO MEDIA) 4 octobre 1996 (1996-10-04) cité dans la demande le document en entier ---	1-10
A	CINATL J ET AL: "PROTEIN-FREE CULTURE OF VERO CELLS: A SUBSTRATE FOR REPLICATION OF HUMAN PATHOGENIC VIRUSES" CELL BIOLOGY INTERNATIONAL, vol. 17, no. 9, 1 janvier 1993 (1993-01-01), pages 885-895, XP000578808 ISSN: 1065-6995 le document en entier ---	1-10

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 septembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/09/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Müller, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. : Internationale No
PCT/FR 99/00578

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	<p>WO 98 46244 A (GILLESSEN HUBERT JEAN MARIE . FR ;FEVA N V (NL)) 22 octobre 1998 (1998-10-22) esp. revendications et page 2, 1.26ff -----</p>	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den e Internationale No

PCT/FR 99/00578

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5498537 A	12-03-1996	AU 1930495 A WO 9524467 A	25-09-1995 14-09-1995
FR 2732347 A	04-10-1996	AUCUN	
WO 9846244 A	22-10-1998	AU 6856498 A CA 2258501 A EP 0912191 A NO 985906 A	11-11-1998 22-10-1998 06-05-1999 26-01-1999